

THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE DIJON

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE DIJON

par

Kianouch SAADATI

AMINO ACIDES LIBRES CHEZ LA BETTERAVE A SUCRE
INFLUENCE DES ENGRAIS AZOTES SUR LES MATIERES AZOTEES
QUI ACCOMPAGNENT LE SUCRE PENDANT LA SACCHARIFICATION

Soutenue le 1er Juillet 1968 devant la Commission d'examen

MM. BARON

Président

KEILLING
HENRY

} Examineurs

T H E S E

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITE DE DIJON

Pour obtenir LE TITRE de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE DIJON

par

Kianouch SAADATI

AMINO ACIDES LIBRES CHEZ LA BETTERAVE A SUCRE.
INFLUENCE DES ENGRAIS AZOTES SUR LES MATIERES AZOTEES
QUI ACCOMPAGNENT LE SUCRE PENDANT LA SACCHARIFICATION.

Soutenue le 1er JUILLET 1968 devant la Commission d'examen

MM. BARON

Président

KEILLING }

HENRY }

Examineurs

Vianouch SAADATI

1968

AMINO ACIDES LIBRES CHEZ LA BETTERAVE A SUCRE.

INFLUENCE DES ENGRAIS AZOTES SUR LES MATIERES AZOTEES
QUI ACCOMPAGNENT LE SUCRE PENDANT LA SACCHARIFICATION.

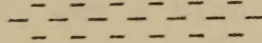
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I.B.A.N.A. - DIJON

FACULTE DES SCIENCES

D I J O N

A MA FEMME ET MA FILLE



Je tiens à remercier Monsieur le Professeur C. BARON, qui a bien voulu m'accepter dans son laboratoire, et m'a guidé tout au long de ce travail. Je suis très heureux de pouvoir lui exprimer, ici, ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur KEILLING, Professeur à l'Institut National Agronomique de PARIS, Directeur de l'I.B.A.N.A., qui m'a reçu dans son laboratoire, et m'a apporté de précieux conseils pour commencer ce travail.

Que Monsieur HENRY, Professeur à la Faculté des Sciences de DIJON, qui a bien voulu manifester son intérêt pour ce travail, accepte mes remerciements respectueux.

Je remercie également Monsieur SAUNIER, Directeur du laboratoire du Syndicat National des Fabricants de Sucre de FRANCE, qui m'a inspiré le sujet de ce travail.

A mes amis et collègues de Laboratoire, Chercheurs et Techniciens, pour l'aide précieuse qu'ils m'ont généreusement apportée.

- TABLE DES MATIERES -

INTRODUCTION

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

A - MATERIEL VEGETAL

B - SITUATION DES ESSAIS

1 - Disposition

2 - Plantation

3 - Substrat

4 - Irrigation

5 - Fumure minérale et fumure organique

C - ECHANTILLONNAGE

1 - Préparation des échantillons

2 - Lyophilisation

D - METHODE D'EXTRACTION DES ACIDES AMINES

1 - Prélèvement d'ECHANTILLONS pour l'extraction

2 - Fixation du matériel et centrifugation

3 - ELIMINATION des substances lipophiles

4 - SEPARATION des différents constituants hydrosolubles sur résines échangeuses d'Ions
(Technique de BISERTE et BOULANGER, 1950)

5 - PREPARATION de la solution d'acides aminés
pour leur dosage

E - METHODE DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES

1 - Méthode de MORRE et STEIN

2 - L'autoanalyseur "TECHNICON"

3 - Procédé d'intégration et accord pour calculer les pics des acides aminés

F - METHODE DE DOSAGE DES SUCRES

1 - Hydrolyse

2 - Méthode de BERTRAND

G - METHODE DE DOSAGE DE L'AZOTE

CHAPITRE II : INFLUENCE DES FUMURES AZOTEES ORGANIQUES
ET DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE, SUR LA
BETTERAVE SUCRIERE.

A - RESULTATS ET DISCUSSION

- I - Influence de la fumure azotée sur la production
de feuilles
- 2 - Influence de la fumure azotée sur la teneur en sucre
- 3 - Influence de la fumure azotée sur la teneur en
azote total
- 4 - Influence de la lumière artificielle

CHAPITRE III : INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE ET ORGANIQUE,
AINSI QUE DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE SUR LES
TENEURS EN ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES,
CHEZ LA BETTERAVE SUCRIERE.

A - RESULTATS

CONCLUSION -

BIBLIOGRAPHIE -

INTRODUCTION

Au cours des trente dernières années, l'étude de l'influence de diverses conditions culturales, et en particulier des fumures, sur la composition chimique de la betterave, a été l'objet de nombreux travaux.

A. ULRICH (II) se penche sur le côté pratique du problème de nutrition minérale de la betterave et sur son alimentation azotée. Appliquant aux pétioles la technique de détection de l'azote par la diphénylamine sulfurique, il montre que l'on peut suivre, dans les champs, l'alimentation azotée, par des tests successifs, et corriger les déficiences par des apports de nitrate en cours de culture.

Afin d'éviter toute perte de richesse ou de pureté, il importe, cependant, de ne pas dépasser la quantité d'azote "critique" que la plante est capable d'absorber avant la récolte.

(4)
J. DUBOURG et ses collaborateurs ont étudié les acides aminés existant dans divers produits de sucrerie de betteraves. Les auteurs ne s'attachent, alors, qu'aux produits extrêmes : la betterave (racine et feuilles) et la mélasse; ils mettent en évidence, dans les betteraves, l'existence de nombreux acides aminés libres, en plus des protéines. Ce sont ces acides aminés que l'on retrouve dans le jus et les sirops de sucreries, et finalement dans les mélasses. Ils sont donc plus importants pour le fabricant de sucre que les protéines, qui sont éliminées pratiquement en totalité. Ces acides aminés constituent une partie importante du "non sucre" soluble des jus : 20 à 25 %, c'est-à-dire presque autant que les sels minéraux.

Le but de ce travail est d'étudier la relation éventuelle existant entre la quantité de fumures azotées utilisées pour la fertilisation des champs de betteraves et les acides aminés libres existant dans la racine des betteraves, ainsi que leur influence sur la teneur en saccharose.

CHAPITRE I

- : - - : -

MATERIEL ET METHODES

- A - MATERIEL VEGETAL
- B - SITUATION DES ESSAIS
- C - ECHANTILLONNAGE
- D - METHODE D'EXTRACTION DES ACIDES AMINES
- E - METHODE DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES
- F - METHODE DE DOSAGE DES SUCRES
- G - METHODE DE DOSAGE DE L'AZOTE

A - MATERIEL VEGETAL

Nos recherches ont été effectuées sur la betterave sucrière "Beta vulgaris": Cères polyploïde n° 2.

Des graines nous furent fournies par l'INSTITUT TECHNIQUE FRANÇAIS de la Betterave Industrielle, et les cultures furent effectuées dans les serres expérimentales de la FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE DIJON.

B - SITUATION DES ESSAIS

I - DISPOSITION

Pour tous nos essais, les plantes ont été cultivées dans une grande serre rectangulaire d'environ 15 m de long sur 6 m de large, divisée sur la longueur en deux compartiments séparés par un écran opaque. La première partie était sous une photopériode de 24 heures avec une intensité lumineuse de , en plus de la lumière naturelle; la deuxième partie ne recevant que cette lumière.

II - PLANTATION

Le semis a eu lieu en dehors de la serre le 3 MAI 1967, dans de petites terrines de 40 x 40 cm (mélange terreux : 1/3 terreau de feuilles - 1/3 terre de plein champ - 1/3 sable).

Les plantules présentant leurs deux premières feuilles bien développées ont été repiquées une première fois dans des petits pots avant d'être mises définitivement en grands pots (n° 24).

Au stade de quatre feuilles, les pots ont été mis alors en serre, pour faciliter les opérations culturales (contrôle de l'irrigation, sarclage) et la mise en lumière artificielle.

La variation de la température de la serre a été sensiblement identique à celle du milieu extérieur.

III - SUBSTRAT

Le milieu de culture utilisé a été prélevé au champ et consistait en argile limoneux : Une analyse de sa structure physique a montré qu'il était constitué de particules de taille :

Tamis N° 40	:	500 μ	2 g.
-"- N° 50	:	400 μ	151 g.
-"- N° 70	:	260 μ	146 g.
-"- N° 90	:	220 μ	83 g.
-"- N° 140	:	140 μ	230 g.
-"- N° 200	:	80 μ	130 g.
-"- N° 300	:	60 μ	170 g.
-"- N° 350	:	50 μ	80 g.
-"- N° 400	:	40 μ	8 g.
TOTAL :			1000 g.

Ce sol n'avait pas reçu de fumures minérales et de matériaux organiques, depuis quelques années.

La terre végétale a été prélevée jusqu'à une profondeur de 30 cm, au début du mois de MAI 1967. Après homogénéisation et séchage, nous avons mis, dans chaque pot, la même quantité de terre.

IV - IRRIGATION

Les arrosages ont été effectués régulièrement, en fonction des besoins des plants, en évitant le lessivage.

V - FUMURE MINERALE ET FUMURE ORGANIQUE

L'expérience a porté uniquement sur le nitrate d'ammoniaque, qui a été utilisé à doses croissantes, soit l'équivalent de 300, 450, 600 et 750 kilogrammes par hectare de nitrate à 34,5 % d'azote, soit 100, 150, 200 et 250 kg d'azote par hectare. Les apports de fumure ont été calculés en tenant compte d'une densité théorique de 160.000 plants à l'hectare.

La fumure de base a comporté l'équivalent de 30 tonnes de fumier de cheval par hectare à : 6,7 d'azote, 2,3 d'acide phosphorique, 7,2 de potasse (kg pour mille kg de fumier), 200 kg de sulfate de potasse et 200 kg de superphosphate. Toutes les doses ont été appliquées aux plants à la date du 30 Mai 1967. (voir tableau I).

FUMURES MINÉRALES et FUMURES ORGANIQUES en Kg/ha	ESSAI A					ESSAI B					ESSAI C					ESSAI D				
	LOTS					LOTS					LOTS					LOTS				
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AZOTE	0	100	150	200	250	0	100	150	200	250	0	100	150	200	250	0	100	150	200	250
P ₂ O ₅	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
POTASSE	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
FUMIER en tonne/ha	30	30	30	30	30						30	30	30	30	30					

TABEAU N° I

DOSÉS DES FUMURES MINÉRALES
ET DES FUMURES ORGANIQUES POUR 4 ESSAIS
ESSAIS C et D, SOUS UNE PHOTOPÉRIODE DE 24 HEURES

Nous avons divisé la serre en quatre essais, contenant chacun 60 pots. Dans chaque essai, les pots ont été disposés en cinq rangées de douze, chaque rangée représentant une dose différente d'engrais azotés. Deux essais ont, en plus, reçu du fumier de cheval (essais A et C).

C - ECHANTILLONNAGE

Nous avons conservé notre produit par lyophilisation. Cette technique de déshydratation s'effectue sous vide, sur un échantillon préalablement congelé. C'est une cryodessiccation. Dans un premier temps, l'eau à l'état congelé est enlevée par sublimation (dessiccation primaire); dans un second temps, l'eau liée est désorbée sous vide poussé (dessiccation secondaire).

I - PREPARATION DES ECHANTILLONS (I)

Après lavage soigné, chaque betterave est partagée en deux moitiés, suivant la longueur, et une tranche fine est découpée sur l'une des moitiés parallèlement à la coupe précédente. Cette tranche est rapidement coupée en morceaux. Les cubes de betterave sont congelés très rapidement, en les plongeant dans l'azote liquide : - 196 °C. Ils sont, ensuite, répartis dans des flacons et conservés dans la carboglace : - 80°C.

II - LYOPHILISATION

Lorsque tous les échantillons sont congelés, ils sont mis sous vide pour sublimer la glace (il faut fournir de la chaleur). La dessiccation primaire s'est effectuée à - 20°C et a duré 78 heures. La dessiccation secondaire à + 20°C a duré 30 heures. Du fait de l'épaisseur du produit dans les flacons, la lyophilisation a été assez longue.

Les flacons contenant les morceaux de betterave lyophilisée, bouchés et paraffinés, sont conservés à - 15°C.

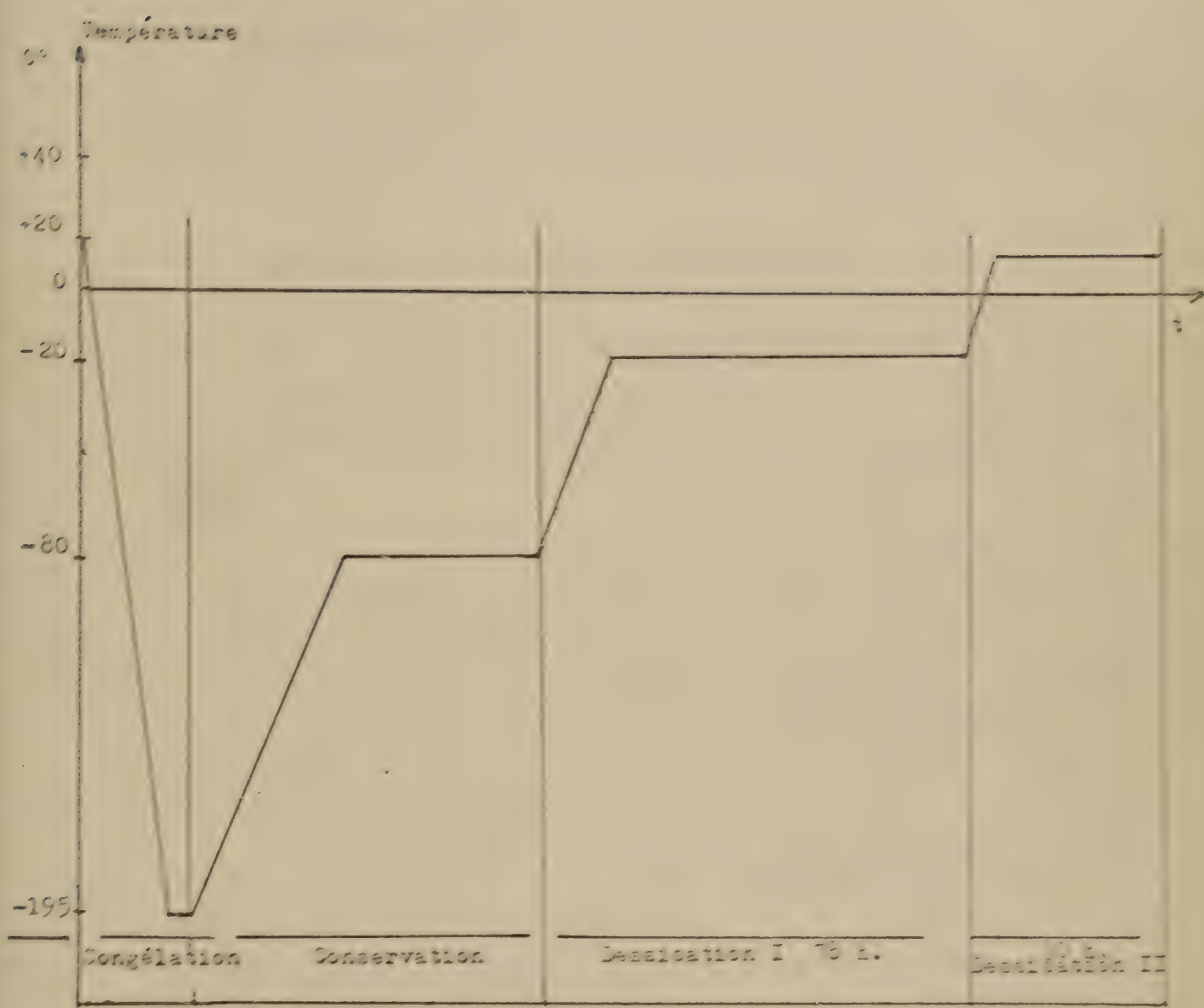


Schéma de l'opération: Lyophilisation

D - METHODE D'EXTRACTION DES ACIDES AMINES LIBRES

(tableau 2)

I - PRELEVEMENT D'ECHANTILLONS POUR L'EXTRACTION

Pour faciliter les calculs de pourcentage des acides aminés, on prélève 1 g. de matériel lyophilisé. On fait donc l'approximation déshydratation = lyophilisation.

II - FIXATION DU MATERIEL ET CENTRIFUGATION (I4)

Un gramme de matériel lyophilisé, après pesée, est fixé dans l'alcool à 97°, préalablement refroidi à - 15°C, par broyage dans un mortier en porcelaine. Le tout est versé, après broyage soigné, dans des pots de centrifugation auxquels on rajoute l'alcool utilisé pour le rinçage au mortier.

Les centrifugations sont faites à une température la plus basse possible à 1500 g, pendant quinze minutes. Le surnageant est recueilli et le culot, lavé avec de l'alcool à 97°, est recentrifugé de même manière. Le lavage du culot est répété plusieurs fois avec des solutions alcooliques de plus en plus diluées (80°, 60°) et, enfin, avec de l'eau distillée.

Les différents surnageants sont réunis. Ce procédé permet de recueillir en solution alcoolique les trois constituants principaux suivants :

- a) les substances lipophiles telles que les lipides, les chlorophylles
- b) les acides aminés ainsi que des petits peptides à 2, 3 ou 4 acides aminés;
- c) les sucres et les acides organiques.

Matériel lyophilisé pesé
broyé au mortier
dans alcool 97 %

1ère centrifugation
15' à 1500 g

culot repris
dans alcool 97 %

1er surnageant

2è centrifugation

2me surnageant

culot repris
dans alcool 80 %

3è centrifugation

3me surnageant

culot repris
dans alcool 60 %

4è centrifugation

4me surnageant

culot repris
dans H₂O

5è centrifugation

5me surnageant

+ volume égal
chloroforme

phase chlo-
roforme
alcool

phase aqueuse

élution sur colonne
Amberlit I20

Acides aminés

sucres

+
ac. org.

Auto analyseur
(dosage)

TABEAU 2

III - ELIMINATION DES SUBSTANCES LIPOPHILES (21)

La solution alcoolique précédemment obtenue est transvasée dans une ampoule à décanter; on lui ajoute un volume égal de chloroforme et on agite légèrement, en évitant la formation d'une émulsion. On obtient ainsi deux phases :

- la phase supérieure aqueuse contient les acides aminés, les petits peptides, les sucres et les acides organiques, ainsi que certains pigments solubles dans l'eau;
- la phase inférieure chloroformique contient les lipides, les chlorophylles

On sépare ces deux phases, puis on lave deux fois de suite la phase chloroformique avec de l'eau distillée, dans le but d'extraire les substances hydrosolubles restantes.

IV - SEPARATION DES DIFFERENTS CONSTITUANTS HYDROSOLUBLES SUR RESINES ECHANGEUSES D'IONS (7) (5)

On sait qu'il est possible de séparer les différents constituants d'un mélange en anions, cations, substances neutres, grâce à diverses résines dites "échangeuses d'ions".

Pour les acides aminés, la résine utilisée au laboratoire est l'amberlite I20 : résine échangeuse de cations, en polystyrène sulfoné, sous la forme $\text{SO}_3 - \text{H}^+$. Les substances amphotères, comme les acides aminés, sont retenues par cette résine, le groupement aminé $\text{R} - \text{NH}_3^+$ s'échangeant avec l'ion H^+ du groupe sulfoné.

a) FIXATION DES ACIDES AMINES SUR LA RESINE :

Cette opération est effectuée au moyen de petites colonnes de 0,9 cm de diamètre, contenant l'amberlite I20 sur une hauteur de 14 cm.

La capacité de cette résine permet la séparation des acides aminés libres d'un broyat de tissus frais ne dépassant pas 15 grammes; (au-delà, il faut utiliser une colonne de plus grande capacité). Une ampoule de verre, ajustée au-dessus de la colonne, au moyen d'un col rodé, permet de faire couler goutte à goutte la solution à purifier.

En suivant le PH, on peut se rendre compte de la bonne marche de la séparation; en effet, les acides aminés étant retenus par la résine, on recueille, à la sortie, les sucres et les acides organiques; ces derniers donnent à la solution un PH acide voisin de 2.

b) ELUTION DES ACIDES AMINES

Elle s'effectue au moyen d'ammoniaque normal, le groupement NH_4^+ prenant la place du radical aminé $R - NH_3^+$. Une quantité de 100 à 120 ml suffit lorsque le poids frais ne dépasse pas 15 g.

Les acides aminés et les petits peptides sont récupérés dans la solution d'ammoniaque.

V - PREPARATION DE LA SOLUTION D'ACIDES AMINES POUR LEUR DOSAGE (12)

a) REPRISE DE LA SOLUTION DANS LE TAMPON CITRATE

La solution est évaporée à sec au moyen de l'évaporateur rotatif. Il faut veiller à ce que la plus grande partie de l'ammoniaque soit éliminée, celle-ci pouvant gêner la séparation chromatographique.

Les acides aminés sont repris dans un volume de tampon citrate à PH 2,5, de telle manière que l'on ait 4 ml de solution correspondant à un gramme de matériel lyophilisé.

Le PH de ce tampon est légèrement plus bas que celui du tampon de départ de l'analyse chromatographique (2,87); il permet la fixation des acides aminés sur la résine de la colonne de séparation, tout en évitant l'hydrolyse des amides, asparagine et glutamine, qui se produirait à un PH plus acide et à 60°C.

b) ANALYSE DES AMIDES APRES HYDROLYSE

Une deuxième analyse est nécessaire pour le dosage de ces deux amides, ainsi que pour la thréonine et la sérine; en effet, ces quatre composés sont élués simultanément.

Pour cette deuxième séparation chromatographique, l'asparagine et la glutamine sont hydrolysées en acides aspartique et glutamique. Leur quantité est évaluée par différence avec la première analyse.

Une quantité déterminée de solution d'acides aminés est ajoutée à un volume égal d'acide chlorhydrique 2 N. La réaction est effectuée au bain-marie bouillant, pendant trois heures, dans un tube pyrex muni d'un réfrigérant à reflux.

A la fin de la réaction, on neutralise l'acide chlorhydrique par de la soude 2 N, de manière à avoir un PH voisin de 2,5. Enfin, on ramène le volume de liquide à une quantité connue de poids sec.

Les petits peptides contenus dans la solution sont aussi hydrolysés par l'acide chlorhydrique 2 N. Les acides aminés qui sont ainsi libérés se surajoutent aux acides aminés libres. C'est pour cette raison que les teneurs en certains acides aminés, comme le glycocolle, la cystine, l'alanine, sont plus fortes dans l'hydrolysat que dans la première analyse.

E - METHODE DE SEPARATION ET DE DOSAGE DES ACIDES AMINES

I - METHODE DE MOORE ET STEIN (7)

Cette méthode est basée sur l'utilisation de résine échangeuse d'ions.

Dans une première série d'expériences, MOORE ET STEIN (1950) utilisèrent une colonne de Dowex 50 sous sa forme H⁺, l'élution des acides aminés se faisant à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique de normalité croissante. En améliorant la technique (1951), ils employèrent une colonne de 160 cm de haut de Dowex 50 X 4 sous forme Na⁺; les acides aminés étaient élués par des solutions tampons à PH croissant de 2,2 à 3,1. L'éluat de la colonne était récupéré au moyen d'un collecteur de fractions; les différentes fractions étaient dosées au colorimètre après révélation par la ninhydrine.

Ces auteurs ont montré à cette occasion l'importance non seulement du PH, mais aussi de la force ionique des tampons, ainsi que de la température de la colonne, sur l'affinité des ions vis-à-vis de la résine.

Grâce à cette méthode, MOORE et STEIN sont arrivés à séparer et à doser tous les acides aminés importants et un bon nombre de leurs dérivés.

L'autocanalyseur TECHNICON rend automatique l'utilisation de la technique de MOORE et STEIN. Les acides aminés sont dosés en continu et sur et à mesure de leur élution. Les concentrations (densités optiques) obtenues pour chaque acide aminé sont mesurées après enregistrement.

II - L'AUTOANALYSEUR TECHNICON (12)

Il comporte deux parties :

- une partie chromatographique
- une partie analytique.

a) LA SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE (schéma 3)

- La colonne : La résine, un échangeur de cations, à groupe sulfoné forme Na^+ , est contenue dans une colonne de 130 cm de haut et de 0,6 cm de diamètre.

Celle-ci est maintenue à une température constante de 60°C , durant toute l'analyse, au moyen d'un manchon avec circulation d'eau.

L'échantillon à analyser est envoyé sur la résine à l'aide d'azote comprimé. Les solutions tampons sont envoyées sur la colonne par une pompe sous une pression de l'ordre de 10-12 kg/cm^2 , à un débit constant de 0,5 ml par minute.

- L'autograd : L'élution des acides aminés se fait au moyen d'un gradient de PH croissant de 2,85 à 5. Les acides aminés à PH acide sont élués en premier et ainsi de suite, au fur et à mesure de l'augmentation de PH et de la force ionique.

Ce gradient continu de PH est obtenu à l'aide de l'autograd, cuve séparée en neuf chambres communiquant entre elles par un fin conduit pouvant être clos par un robinet. Trois tampons de PH 2,87, 3,80 et 5 suffisent pour obtenir ce gradient : par une répartition étudiée de chacun d'eux dans les divers compartiments, on obtient, à partir du temps zéro (ouverture des robinets) une solution de PH et de force ionique croissant dans le temps.

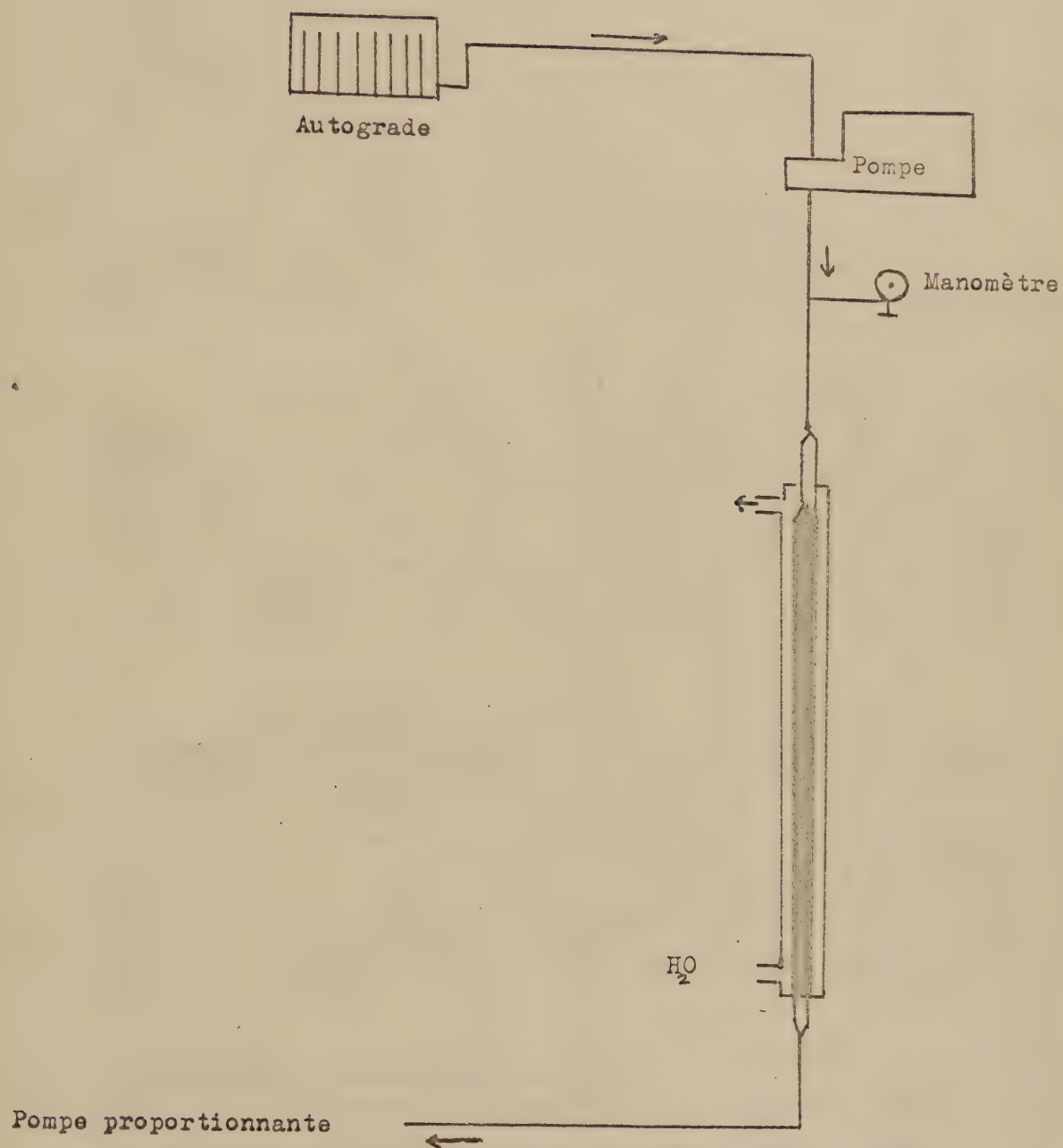


Schéma No. 3 : Méthode de dosage des acides aminés libres:
L'Autoanalyseur Technicon. La partie Chromatographique.

COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPONS

Pour un litre de tampon à PH de :	2,87	3,80	5,00
Citrate de sodium (trisodique)	14,71 g	14,71 g	14,71 g
Soude 2 N	25 ml	25 ml	25 ml
Thiodiglycol	5 ml	5 ml	0
Chlorure de sodium	0	0	37,07 g

(Ebullition pour décarbonater)

Ajustage du PH avec l'acide chlorhydrique 6 N

Brij 35	10 ml	10 ml	10 ml
---------	-------	-------	-------

Le thiodiglycol évite la destruction des acides aminés soufrés : cystine, méthionine; il n'est pas nécessaire d'en mettre dans le tampon PH 5, car ces acides aminés sont élués de la colonne avant que ce tampon n'intervienne.

Le Brij 35 (solution : 100 g de Brij pour 200 ml d'eau) est un détergent qui évite les infections bactériennes.

b) LA PARTIE ANALYTIQUE (schéma 4)

- La pompe proportionnante - A la sortie de la colonne, l'éluant est aspiré par la pompe proportionnante; il s'agit de rouleaux en acier actionnés par une crémaillère qui, par écrasement de tubes en polyvinyle, aspirent et envoient le liquide dans le système analytique. Seule, une partie aliquote de l'éluat est envoyée dans le circuit, le reste étant rejeté à l'évier.

- Révélation des acides aminés - Le mélange avec la ninhydrine s'effectue dès la sortie de la pompe. Dans le même temps, une arrivée d'azote provoque dans le tube conducteur une segmentation du liquide: cela évite le mélange par diffusion des substances à analyser.

La solution, par un serpentín de 10 mètres de long, traverse un bain-marie d'éthylène glycol maintenu à une température constante de 95°C.

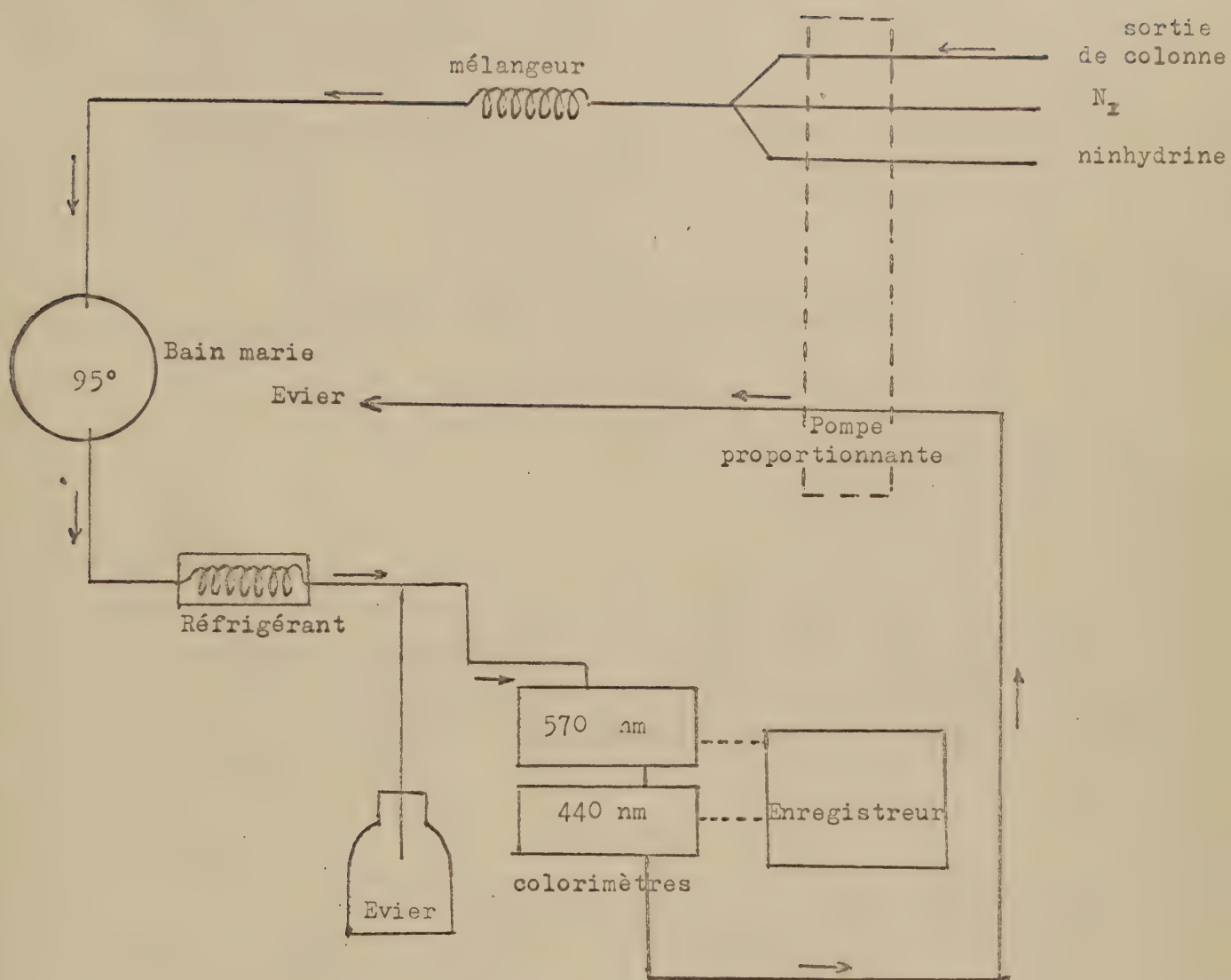


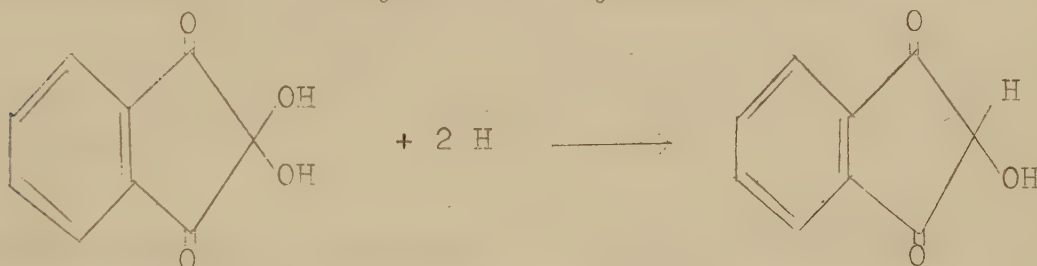
Schéma No. 4 : Méthode de dosage des acides aminés:
L'autoanalyseur TECHNICON, la partie analytique.

PRINCIPE DE LA REVELATION (2)

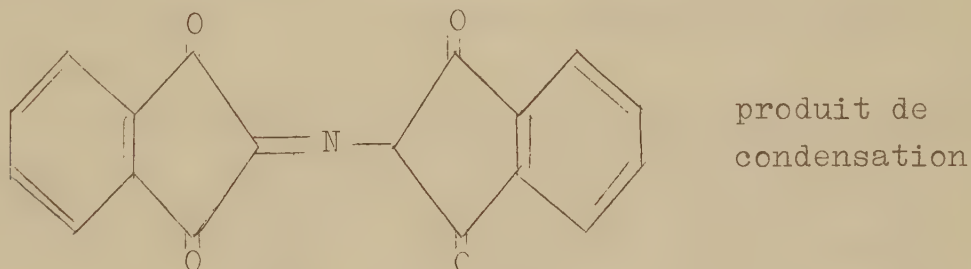
La ninhydrine, à la température de 95°C, réagit sur les acides aminés en donnant du gaz carbonique, de l'ammoniaque et l'aldéhyde correspondant



Cette réaction a pour contre-partie la réduction d'une molécule de ninydrine en hydrindantine



Une molécule de ninhydrine et une molécule d'hydrindantine réagissent avec l'ammoniaque formé pour donner un produit de condensation qui, à un PH supérieur à 4, donne une coloration bleu violet, avec un maximum d'absorption à 570 m



Avec les acides aminés, proline et hydroxyproline, la coloration obtenue est jaune; c'est la raison pour laquelle il est nécessaire d'utiliser un deuxième colorimètre pour les doser, le maximum d'absorption se situant à 440nm .

PREPARATION DE LA SOLUTION DE NINHYDRINE, SELON MOORE
ET STEIN (1954)

On dissout 12 g de ninhydrine et 0,9 g d'hydrindantine dans 390 ml de méthyl-cellosolve (l'hydrindantine est préparée par réduction de la ninhydrine par l'acide ascorbique). Pour obtenir un maximum d'intensité de la coloration, on ajoute 210 ml de tampon acétate à PH 5,51. Cette solution est conservée sous pression d'azote.

Au moment de l'emploi, on lui adjoint 2400 ml d'une solution de méthyl-cellosolve à 50 % dans l'eau.

Les concentrations données ici correspondent à celles utilisées pour une analyse normale et pour son hydrolysats.

- Dosage des acides aminés : La solution est dosée en continu par colorimétrie et les résultats sont enregistrés. Cependant, avant le passage dans la cuve du colorimètre, un tube en T permet d'éliminer les bulles d'azote.

Tous les acides aminés sont dosés à 570 nm, sauf proline et hydroxyproline qui le sont à 440 nm.

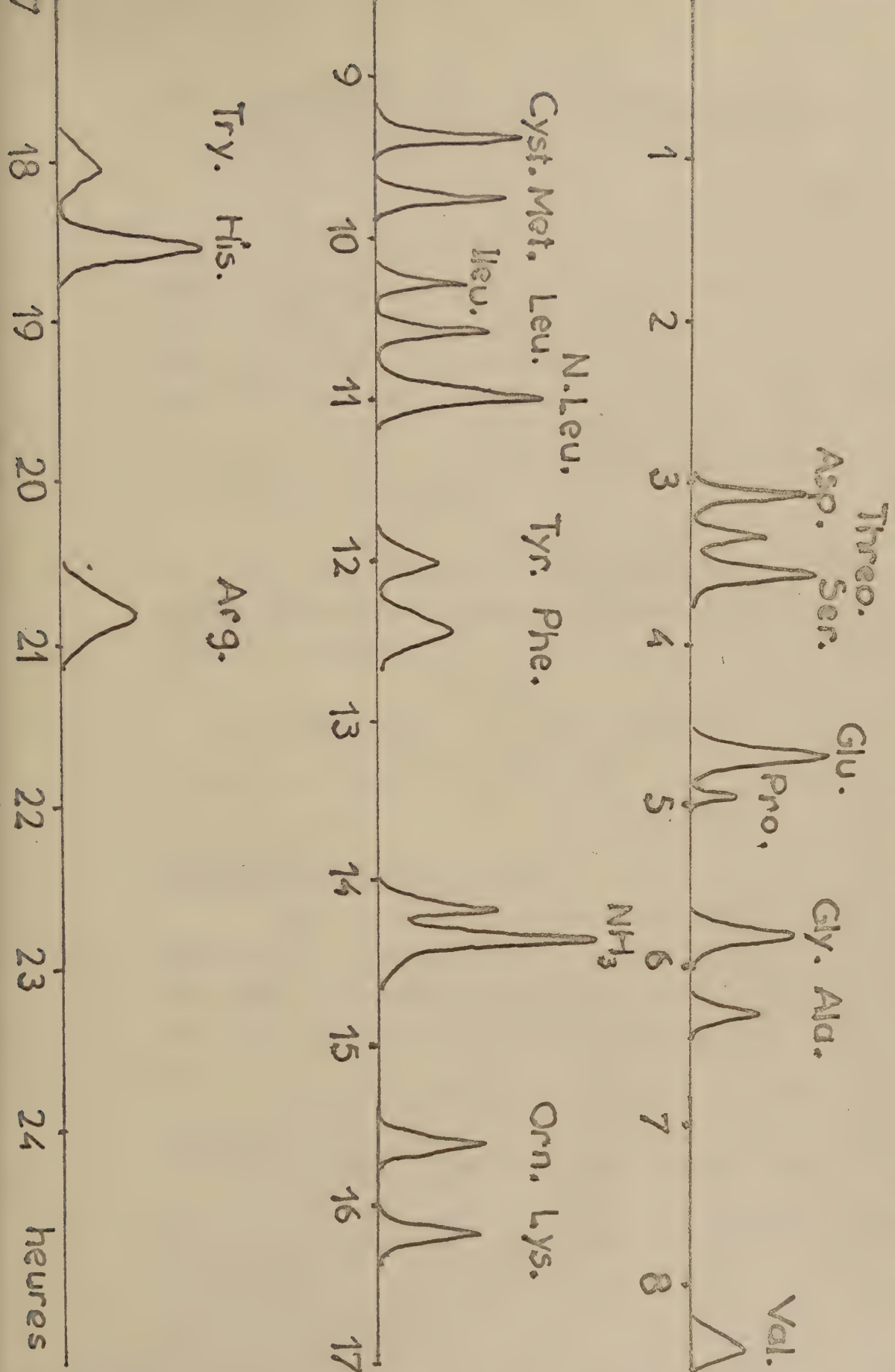
L'ordre de sortie des acides aminés est donné à la page 19.

Il faut environ 22 heures pour une analyse complète. Les valeurs pour chaque acide aminé sont obtenues par intégration des différents pics (voir le graphique qui montre l'ordre d'élution des différents acides aminés).

Afin de s'assurer que la réaction à la ninhydrine est correcte, à chaque analyse, on introduit, en plus de l'échantillon, une quantité déterminée d'un acide aminé non reconnu dans les tissus végétaux, à savoir la norleucine à raison de 0,1 micromole.

Entre chaque analyse, la résine est régénérée par la soude 0.2 N puis remise sous tampon de départ à PH 2,87.

D.O.



L'Autoanalyseur TECHNICON : ordre d'élution des différents acides aminés.

III - PROCEDE D'INTEGRATION STANDARD POUR CALCULER LES PICS DES ACIDES AMINES (voir schéma 5) (I9)

$$(O.D.) o = a - b = 0,303 - 0,034 = 0,269$$

$$I/2 (O.D.) o = I/2 (a - b) = 0,134$$

Donc la hauteur totale t est mesurée pour :

$$I/2 (a - b) + b = 0,168$$

Tous les quatre points, on a un point noir; on compte donc tous les points noirs après le premier marqué "0"

$$5 \times 4 = 20$$

On compte tous les points non noirs entre "0" et "5" et la ligne à mi-hauteur

$$2$$

On compte, enfin, l'intervalle exprimé en fraction de points entre les deux derniers points non noirs et la ligne à mi-hauteur

$$0,5$$

$$\text{Total : } 20 + 2 + 0,5 = 22,5$$

Ainsi la surface est donnée pour :

$$n (O.D.) o = (22,5) (0,269) = 6,06$$

DESCRIPTION DE L'EXPERIENCE

On a mis sur la colonne de l'appareil une solution standard de 18 amino-acides, à raison de $Q = 0,25$ moles de chaque acide aminé et, pour l'acide aminé considéré, pour un calcul identique, on a obtenu la surface standard $n (O.D.) = 14,54$.

Donc, le nombre de moles de l'acide aminé considéré sera de :

$$Q = \frac{6,06}{14,54} \times 0,25 = 0,101 \text{ moles dans l'échantillon}$$

de 0,1 ml par exemple porté sur la colonne de l'appareil.

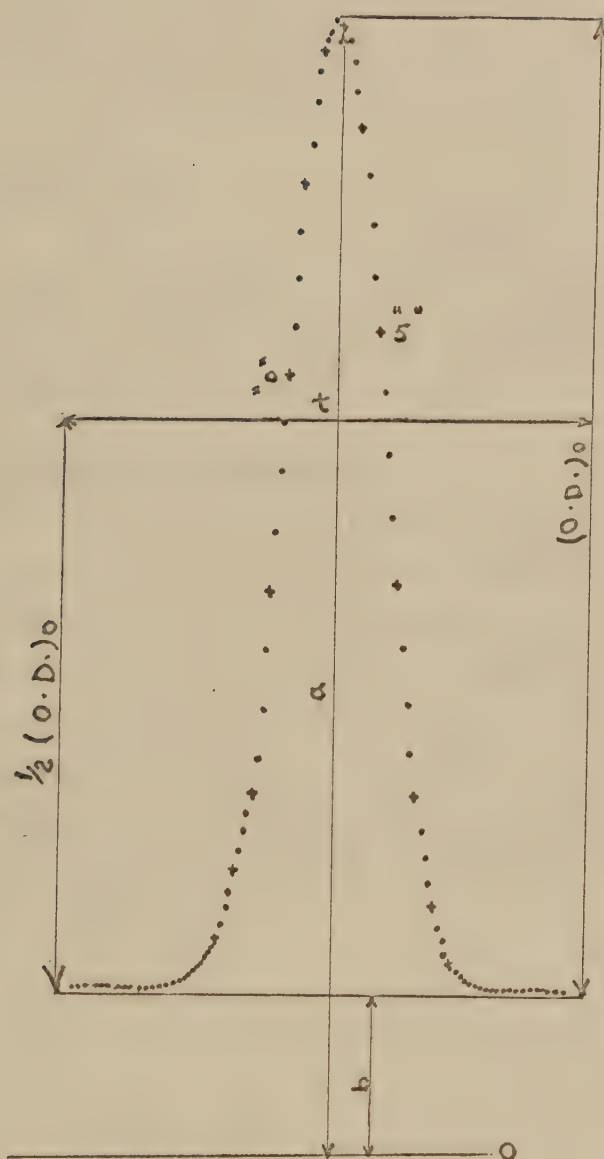


Schéma No. 5

$$(D.O.) = a - b = 0,303 - 0,034 = 0,269$$

$$1/2 (D.O.) = 1/2 a - b = 0,134$$

$$1/2 (a-b) + b = 0,168$$

$$5 \times 4 = 20$$

$$\text{Total} = 20 + 2 + 0,5 = 22,5$$

$$n(D.O.) = 22,5 \times 0,269 = 6,06$$

$$q = \frac{6,06}{14,94} \times 0,25 = 0,101 \text{ umoles}$$

F - METHODE DE DOSAGE DES SUCRES (3)

SUCRES REDUCTEURS : nous avons dosé les sucres réducteurs par la méthode de BERTRAND, après hydrolyse du produit. Nous avons essayé plusieurs temps d'hydrolyse (1, 2, 3 H.) et nous avons pris comme temps d'hydrolyse celui qui donnait les résultats les plus reproductibles, soit 1 heure.

I - HYDROLYSE

Dans un ballon, on pèse exactement 1 g de produit que l'on additionne de 95 ml d'eau et 5 ml d'Hcl R.P. L'hydrolyse est faite avec réfrigérant à reflux à une température de 50 à 60°C.

2 - METHODE DE BERTRAND

Nous partons d'une prise de 5 ml, à laquelle on ajoute respectivement 20 ml de la solution cuprique et 20 ml de la liqueur de Fehling. Après ébullition de trois minutes, on passe sur verre fritté n° 4 qui retient l'oxyde cuivreux précipité. Celui-ci est dissout par une solution de sulfate ferrique qui oxyde le cuivre cuivreux en cuivre cuivrique. Le sulfate ferreux formé est dosé par une solution de permanganate de potassium à 5 g/l (1 ml correspond à 10,1 mg de cu).

G - METHODE DE DOSAGE DE L'AZOTE (6)

AZOTE TOTAL -

Il est dosé selon la méthode de KJELDAHL, à l'aide d'un appareil de PARNAS et WAGNER.

La prise de quelques centaines de mg de produit est minéralisée par l'acide sulfurique, en présence d'un catalyseur (Hg ou $\text{K}_2 \text{SO}_4$) dans un matras de KJELDAHL. 5 ml du produit de minéralisation est dilué jusqu'à 25 ml et, ensuite, introduit dans l'appareil de PARNAS. L'ammoniaque libéré du $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ par la lessive de soude, recueilli. Cette solution est, alors, titrée par de l'acide sulfurique N/50 en présence d'un indicateur, le Rouge de méthyle.

CHAPITRE II

INFLUENCE DES FUMURES AZOTEES, ORGANIQUES

ET DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE

SUR LA BETTERAVE SUCRIERE.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 3.

Leurs analyses, au cours de cette étude, nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

I - INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE SUR LA PRODUCTION DE FEUILLES (tableau 3 colonne 3)

Le développement du bouquet foliaire est considérablement accru dans les lots à forte application d'azote et de matériel organique, aussi bien au cours de la végétation qu'au moment de la récolte. Nous avons observé, pour les lots 6 à 10 et 16 à 20, que l'importance des feuilles a diminué à partir du début de Septembre, tandis que le bouquet foliaire est resté à peu près constant pour les deux premiers essais A et B.

On remarque que, pour les lots 3 à 5 et 13 à 15, le bouquet foliaire n'a pas cessé de croître pendant toute la végétation, pour les doses fortes d'azote et de matériel organique.

II - INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE SUR LA TENEUR EN SUCRE

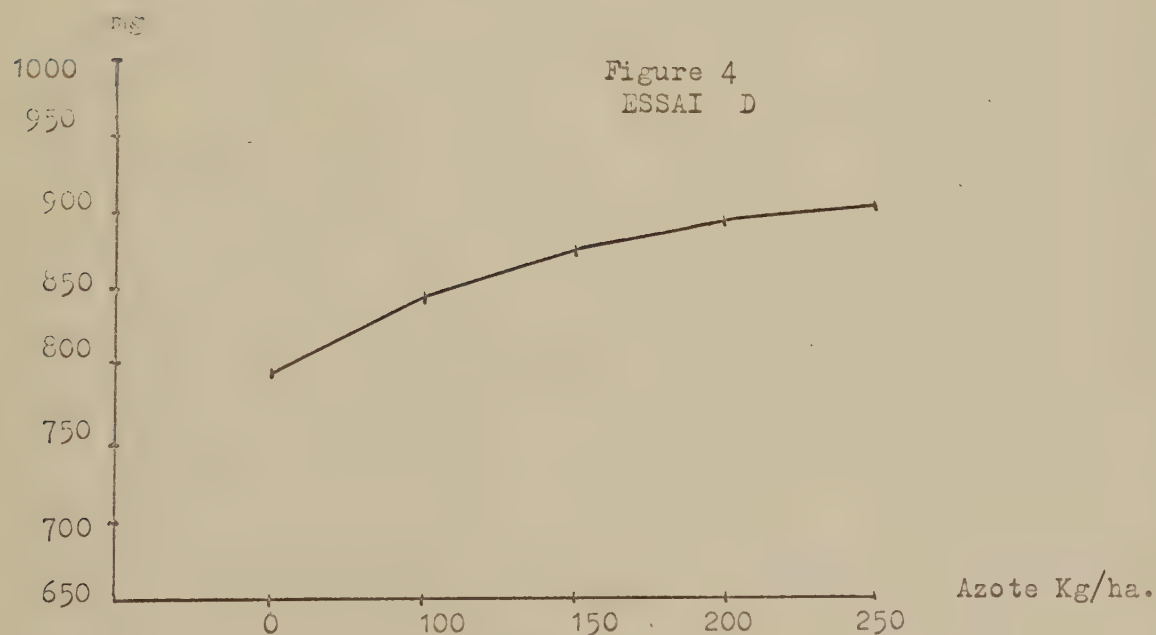
On observe aisément (figures 1, 2, 3) comment la richesse et le rendement en sucre décroissent avec l'augmentation progressive de la dose d'engrais azoté. Par contre, on observe une augmentation de la teneur en sucre (essai D, figure 4), malgré les doses croissantes de fumure azotée.

Les figures 5, 6, 7 nous montrent de manière analogue l'influence de la dose croissante d'engrais azoté. On y voit très nettement que l'augmentation de la dose va de pair avec une accumulation de plus en plus importante de non-sucre dans la betterave.

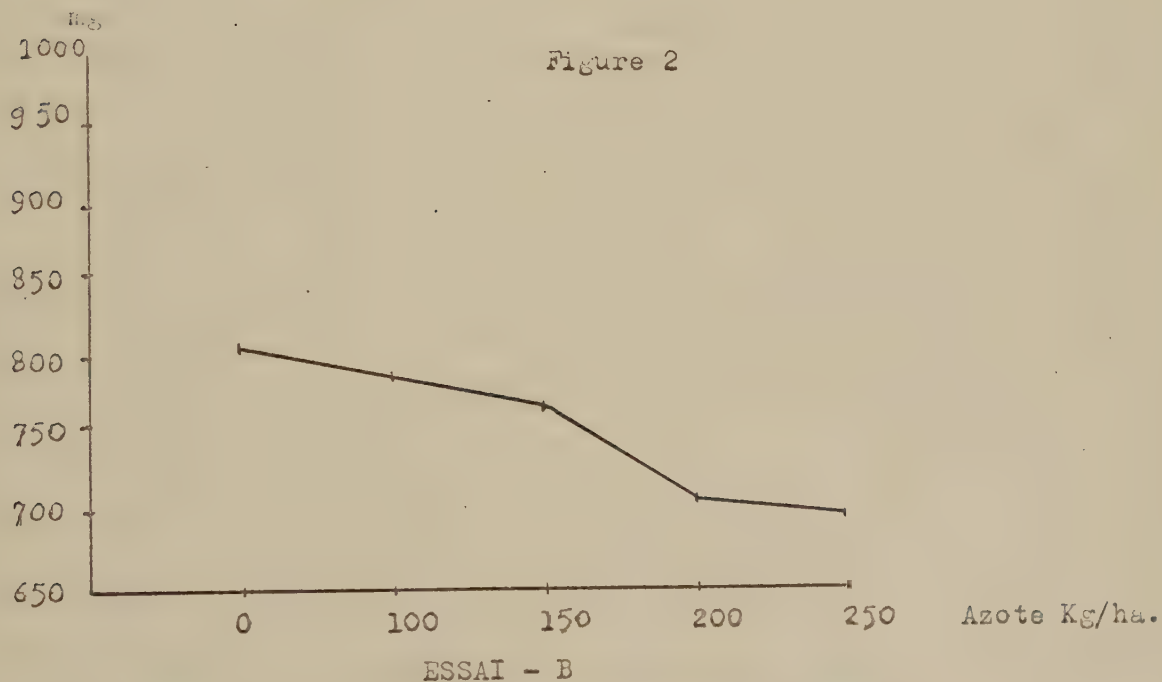
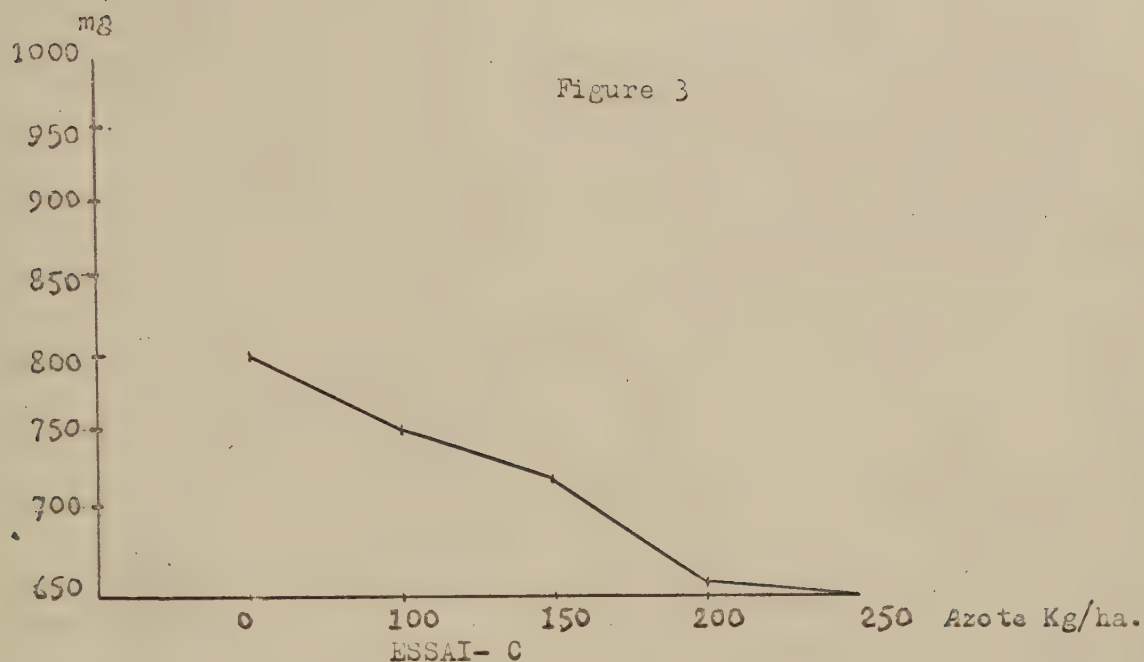
ESSAIS	LOTS	I	2	3	4	5	6
		Poids moyen de la racine en g	Poids moyen du bouquet de feuilles en g	Sucre en mg/g Poids sec	Non-Sucre en mg/g Poids sec	Azote total en mg/g Poids sec	Azote total en mg/5 ml de jus
A	I	710	280	840	160	5	8,4
	2	638	303	780	220	5,6	8,8
	3	630	320	770	230	6,7	9,5
	4	775	375	770	230	9,5	11,7
	5	690	405	760	240	5	8,4
B	6	78	20	810	190	2,8	2,9
	7	234	34	790	210	3,3	3,5
	8	251	50	770	230	3,9	3,9
	9	398	62	710	290	3,3	3,2
	10	400	68	700	300	4,2	6,6
C	11	750	310	820	180	6,5	7,3
	12	800	430	760	240	8,7	9,2
	13	775	480	730	270	9,3	9,5
	14	675	625	670	330	16,2	12,02
	15	720	375	680	320	9,5	10,8
D	16	70	25	800	200	3,3	2,1
	17	198	50	850	150	3,9	3,2
	18	273	45	880	120	5	3,3
	19	328	60	900	100	4,2	2,9
	20	411	70	910	90	5,3	4,7

TABIEAU N° 3

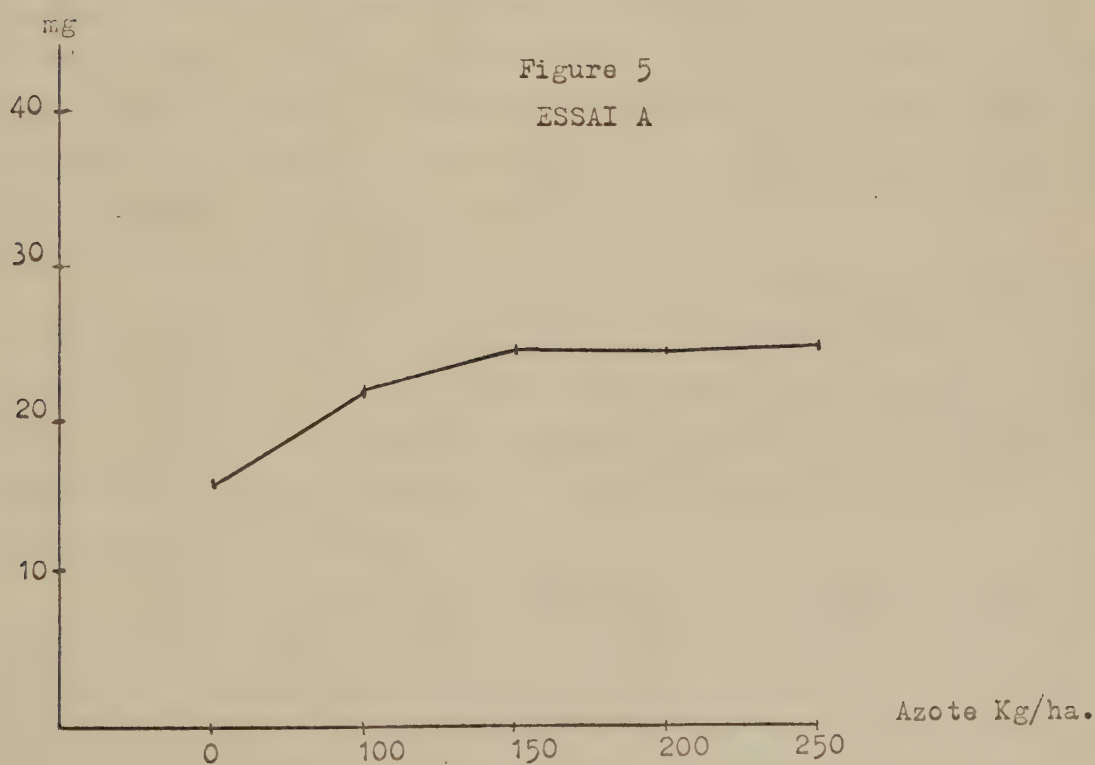
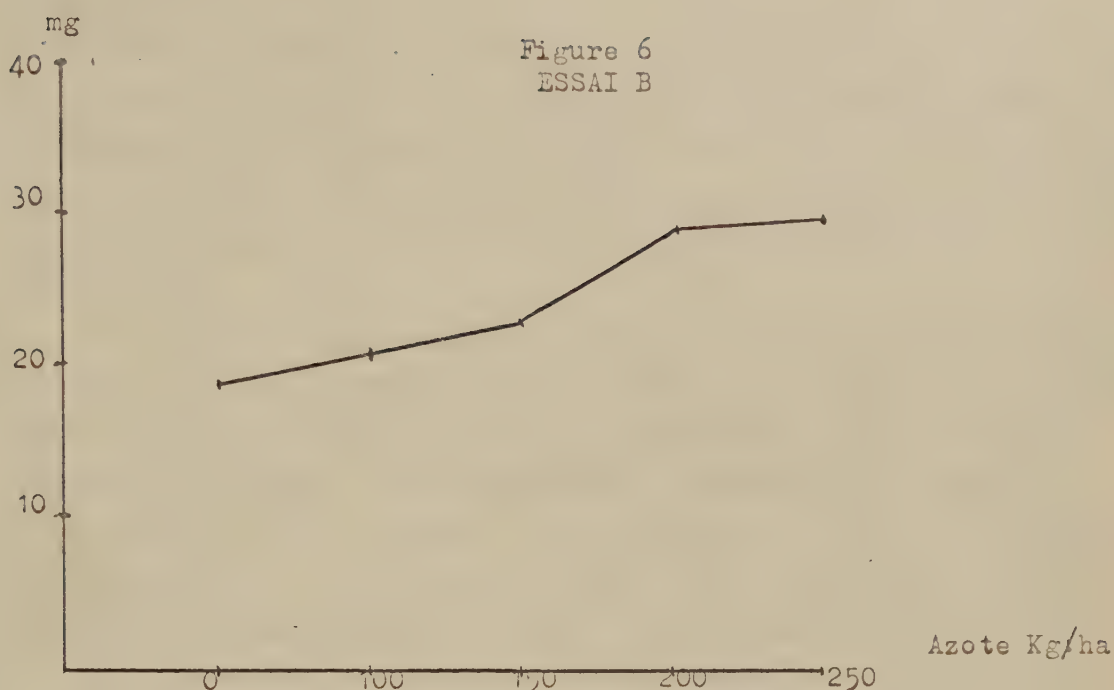
INFLUENCE DES FUMURES AZOTÉES, ORGANIQUES, ET DE LA LUMIÈRE ARTIFICIELLE
SUR LA BETTERAVE A LA RECOLTE



Teneur en sucre en mg/g de matériel lyophilisé
en fonction de la teneur en fumures azotées.



Teneur en sucre en mg/g de matériel lyophilisé
 en fonction de la teneur en fumures azotées.
 en



Teneur en non sucre en mg/g de matériel lyophilisé
en fonction de la teneur en fumures azotées.

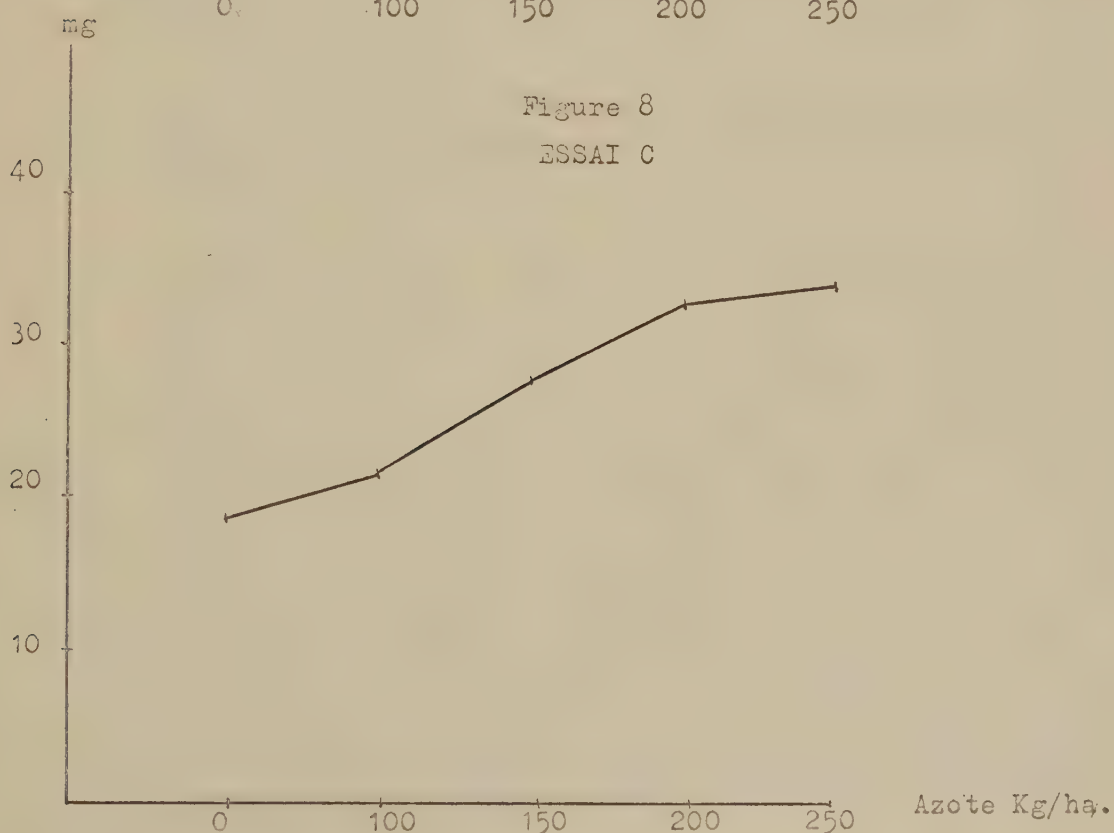
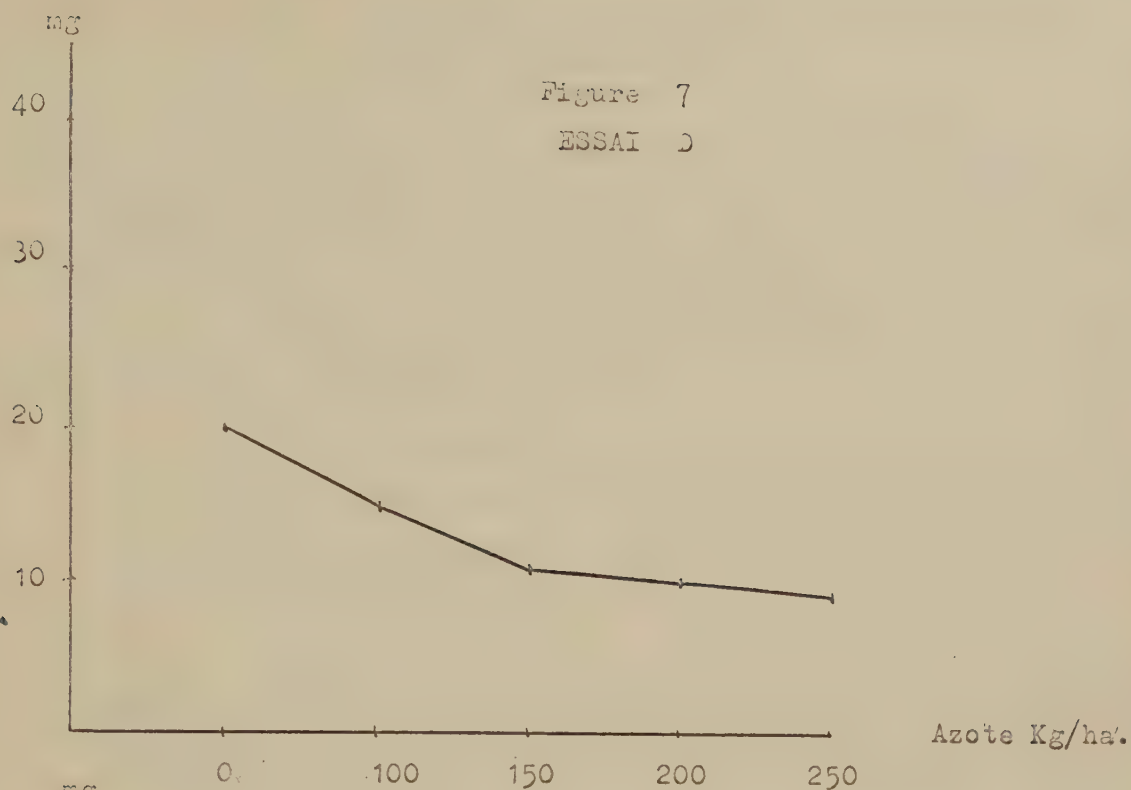
On remarque, dans l'essai D (fig. 8), une diminution de la teneur en non-sucre et, par contre, augmentation de la teneur en sucre. L'augmentation de la teneur en sucre dans la figure 4, essai D, peut s'expliquer par l'observation de cet essai au cours de la végétation. La lumière artificielle appliquée pendant toute la végétation stimule l'utilisation d'une quantité importante d'azote, au profit de la croissance de bouquet foliaire, au cours des 4 premiers mois de végétation.

Divers auteurs (8, 15, 16) constatent que la plus grande part de l'azote est absorbée en Juin-Juillet et au début du mois d'Août, durant la période de formation du bouquet foliaire. Ils tirent des conséquences quant à l'utilisation de l'azote, en particulier. Au mois d'Août, la racine n'a atteint que la moitié de son poids, tandis que le bouquet foliaire a déjà atteint un poids maximum.

Dans cette période, les auteurs constatent que la quantité de matières minérales absorbées rapportées à la matière sèche diminue constamment avec le temps, en raison de l'élaboration des sucres provenant de la photosynthèse. Alors qu'une jeune betterave donne, par rapport à la matière sèche, plus de 24 % de cendres, une betterave à pleine maturité n'en laisse plus que 3,5 %.

Les produits accumulés dans le feuillage serviront à la croissance de la racine et à l'accumulation du sucre dans la racine. Il est donc nécessaire que la plante bénéficie d'un fort approvisionnement en azote, au moment de la première période végétative, puis, à partir du mois d'Août, d'un simple entretien.

Donc, dans notre essai D, la betterave prélève la plus grande partie de l'azote dans la phase de sa croissance active. Le prélèvement d'azote est plus actif dans l'essai cultivé en lumière artificielle. Tandis que, dans l'essai C, cultivé dans les mêmes conditions, mais avec du matériel organique, la phase de croissance est prolongée à cause de l'abondance d'azote.



Teneur en non sucre en mg/g de matériel lyophilisé
en fonction de la teneur en fumures azotées.

III - INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE SUR LA TENEUR EN AZOTE TOTAL

Les figures 9, 10, 11, 12, qui représentent quatre essais classés par quantités d'azote croissantes, montrent qu'il existe une certaine relation entre les doses d'azote appliquées et la teneur en azote dans les racines.

L'influence de la fumure azotée est évidente (voir tableau 3 colonnes 5 et 6).

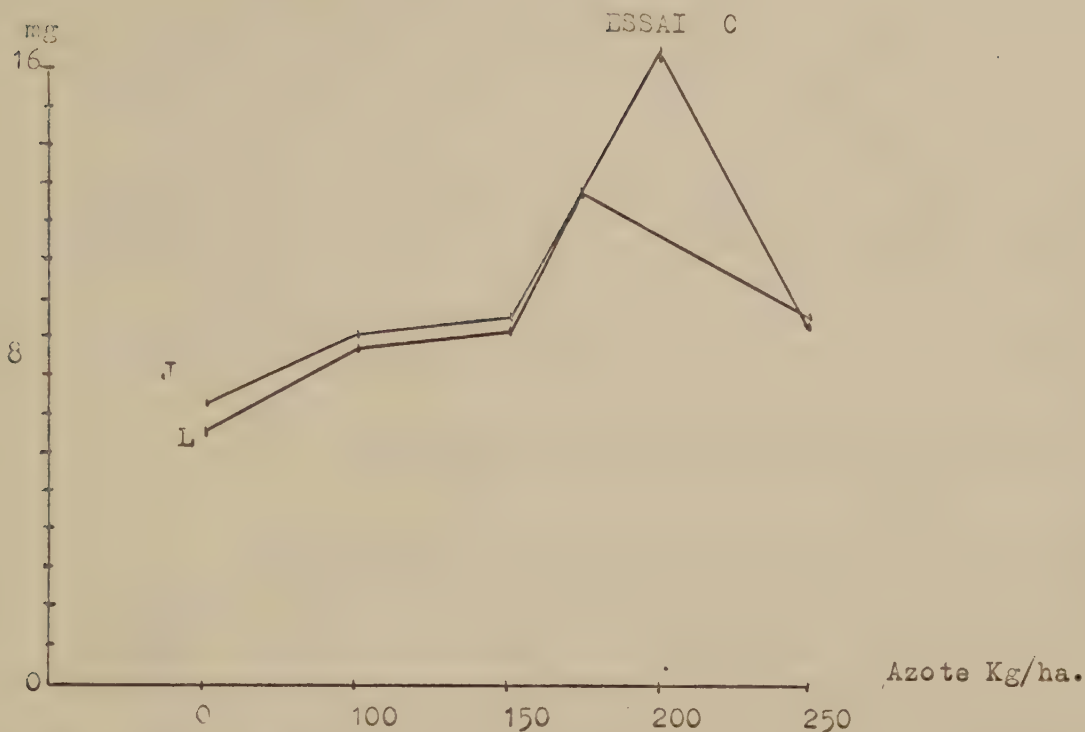
1) On remarque que les teneurs en azote dans le jus et matériel lyophilisé de la betterave varient de la même façon pour les essais où l'on a appliqué des doses croissantes de fumure azotée.

2) Une augmentation progressive de la teneur en azote jusqu'au quatrième lot des essais A et C. Pour le cinquième lot, on remarque, dans les deux cas, une diminution; cela pourrait s'expliquer par : (9) (10)

- a) la présence d'un excès d'azote pendant la végétation retarde la maturation de la plante, et c'est un inconvénient pour la racine de betterave.
- b) Avant la récolte, le nombre de microorganismes qui ont accumulé l'azote commencent à mourir. L'azote libéré est alors absorbé par la plante, au moment où les quantités d'azote devraient être réduites, pour éviter la croissance de nouvelles feuilles. Ceci entraîne un déséquilibre dans le cycle de végétation de la betterave.

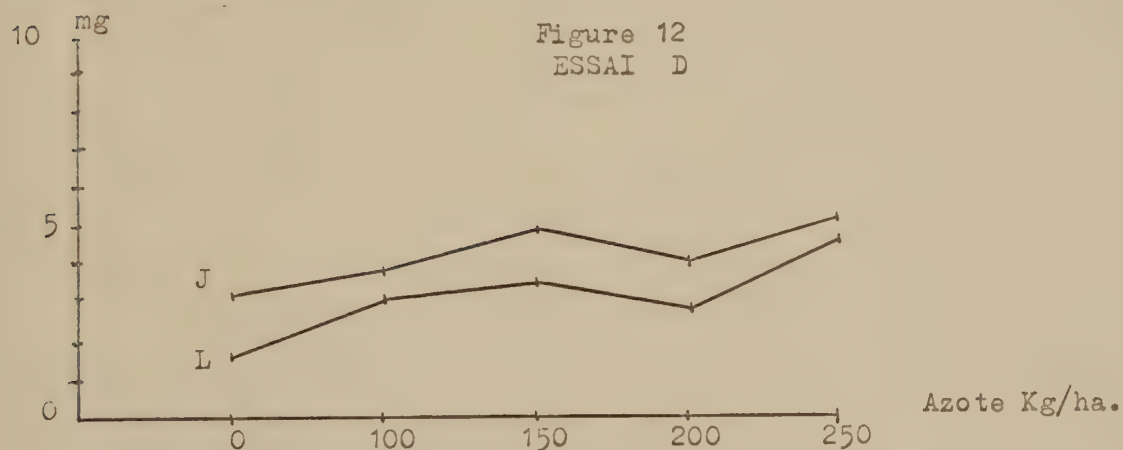
3) Malgré l'application de quantités croissantes d'azote et de matériel organique, pour les essais A et C, le poids de la racine reste plus ou moins constant pour les cinq lots. Pour les lots B et D, cultivés sans matériel organique mais avec des quantités croissantes d'azote, on remarque une augmentation du poids moyen de la racine.

Figure 11



J: Teneur en azote en mg/5ml de jus de betterave en fonction de la teneur en fumures azotées.

L: Teneur en azote en mg/g de matériel lyophilisé en fonction de la teneur en fumures azotées.



Si nous faisons une comparaison des résultats entre le poids moyen de la racine, le poids moyen de la feuille et la teneur en sucre et en azote, nous observons que :

- pour les essais A et C, le rapport du poids des feuilles avec le poids des racines est environ de moitié, tandis que, pour les essais B et D, ce rapport est plus bas.

- pour tous les essais, la teneur en azote est proportionnelle à l'azote apporté.

IV - INFLUENCE DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE

Nous avons observé, dans les lots II à I5, cultivés en lumière artificielle de 24 heures et en lumière naturelle pendant toute la saison de croissance, un faible pourcentage en sucre et un pourcentage plus élevé d'azote, dans la racine. En même temps, les bouquets foliaires ont augmenté. Certains chercheurs (13) constatent que le sucre formé dans les feuilles suffit au métabolisme de base de la plante (bouquet foliaire et développement fibreux de la racine), mais reste insuffisant à la constitution des réserves en sucre de la racine.

CHAPITRE III

INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE ET ORGANIQUE

AINSI QUE DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE SUR

LES TENEURS EN ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES

CHEZ LA BETTERAVE SUCRIERE.

INFLUENCE DE LA FUMURE AZOTEE ET ORGANIQUE
AINSI QUE DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE, SUR LES
TENEURS EN ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES
CHEZ LA BETTERAVE SUCRIERE

Les composés azotés jouent un rôle important dans le développement des betteraves sucrières. Des essais préliminaires indiquent que l'azote des acides aminés libres est présent en grande quantité, surtout dans les racines. Les variations de l'azote des acides aminés libres, dans la racine, peuvent être associées aux variations de la teneur en sucre.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 4.

Les analyses des acides aminés libres, au cours de cette étude, nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

En général, les acides aspartique et glutamique et leurs amides (asparagine et glutamine) sont très abondants dans la betterave.

Dans nos essais, on remarque que l'acide aspartique et l'asparagine augmentent pour tous les lots (tableau 4). Cette augmentation est plus importante pour les essais A et C. Pour l'essai A (lot n° 4), cultivé en lumière naturelle et avec du matériel organique, nous avons obtenu :

- Teneur en acide aspartique : $28,8\mu$ môle/g poids sec.
- Teneur en asparagine : 20μ môle/g poids sec.

Pour l'essai C (lot n° 14), cultivé en lumière artificielle et avec du matériel organique :

- Teneur en asparagine : $15,2\mu$ môle/g poids sec.
- Teneur en acide aspartique : 44μ môle/g poids sec

(voir figures 15, 16).

Pour les autres lots, la teneur en acide aspartique et asparagine va de pair avec les concentrations croissantes en azote.

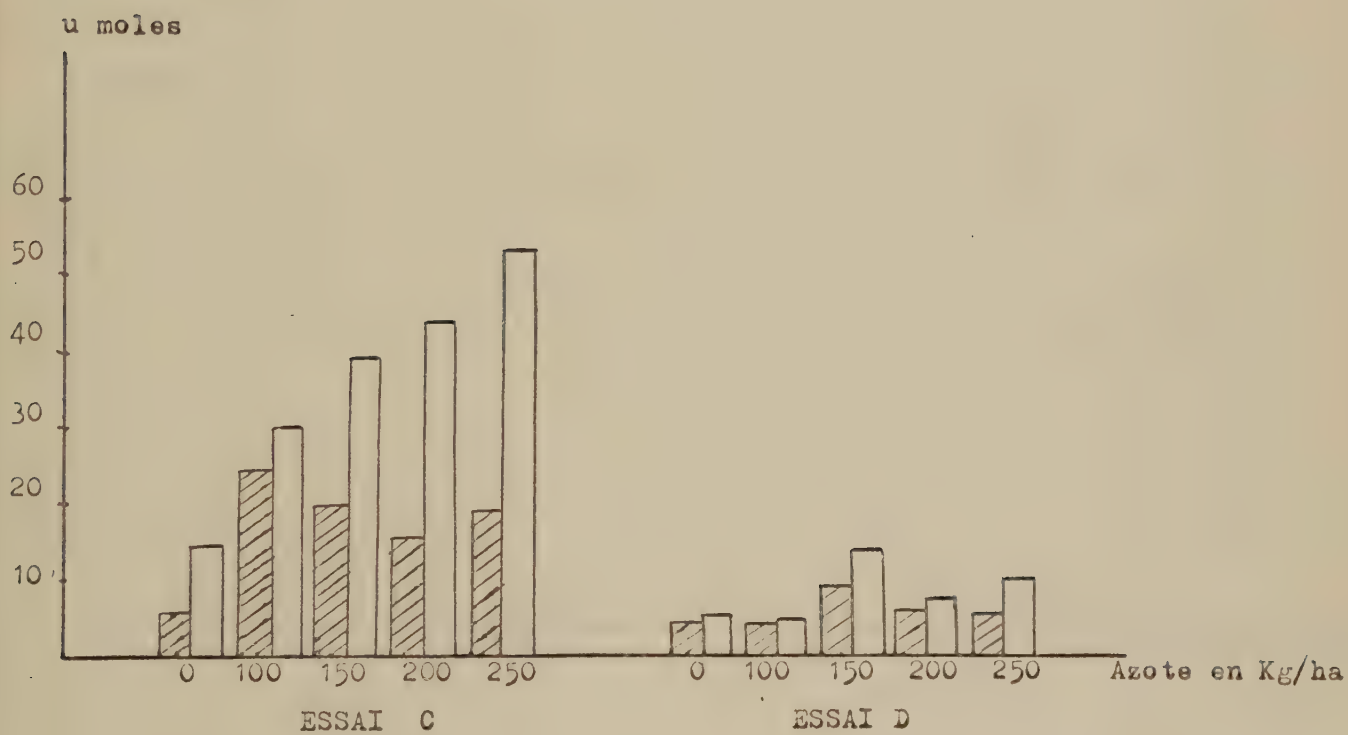
ESSAIS	LOTS	Acide asp.	Asp. NH ₂	Thréo.	Sér.	Acide glu.	Glu. NH ₂	Gly.	Ala.
A	I	15,4	8,5	1,8	5,2	21,8	10,9	0,92	1,12
	2	16,4	9,3	2,8	6,8	25	11	1,96	2,24
	3	19	12	2,8	7,7	51,6	10,5	2,88	5,44
	4	28,8	20		11,1	89,6	24,6	2,76	5,92
	5	7,3	3,7	1	2,2	16,3	4,6	0,46	0,84
B	6	4,4	3,4	0,24	1,1	6	2,4	0,24	0,32
	7	4,4	2,3		2,1	10,1	6,6	0,92	1,52
	8	5,5				12,4	7,2	0,44	0,88
	9	5,6	4,4	2,8	5,4	8,6	7,2	0,60	0,72
	10	4,3	3,7		1,3	16	14,8	0,68	1,04
C	11	14,1	5,2		6,6	29,6	6,9	0,72	0,96
	12	25,4	24		13,7	144	32	3,36	8,56
	13	39,2	19,6		11,8	141,2	54,4	2,20	15,2
	14	44	15,2		20,8	280	36	8	16
	15	54,4	18,9		14,4	144	54	2,16	5,6
D	16	5,1	4,2			6,5	4,4	0,44	0,32
	17	4,8	4		2	9,6	4,1	0,36	0,44
	18	9,7	9,7	2	3,2	32	9,1	0,64	1
	19	7,2	6,2		3,2	18,8	8,8	0,56	1,44
	20	10,6	5,4		3,4	20,1	9,8	0,64	0,8

TABEAU N° 4

INFLUENCE DES FUMURES AZOTEES, ORGANIQUES ET DE LA LUMIERE ARTIFICIELLE SUR LES TENEURS EN ACIDES AMINES ET AMIDES LIBRES (en mpole par gramme poids sec).

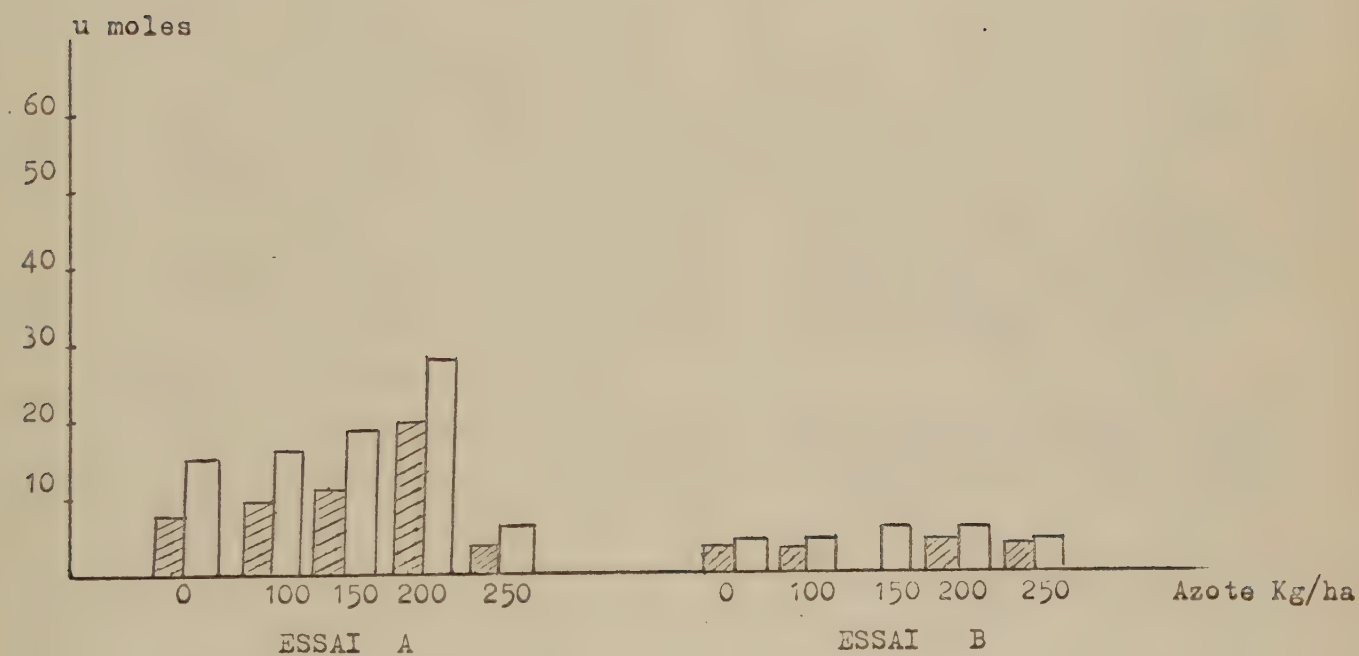
Val.	Cys.	Met.	Ileu.	Leu.	Tyr.	Phe.	Lys.	His.	Arg.
1,52	0,44	0,08	0,08	2,8	2,88		0,32		
2,68			1,08	2,24	2,5				0,72
2,56			2,88	2,8	4,32	7,7	1,44	1,44	0,64
3,92			4,96	5,76	12	24	6	0,96	2,24
0,36							0,36	0,32	0,36
0,12							0,12	0,12	0,08
							0,32	0,28	0,32
0,60			I	1,08			0,28	0,36	0,08
1,08									0,28
0,92			2,04	2,08			0,36	0,56	0,24
1,04							2,24	1,12	2,2
4,08			5,20	4,8	4,08	3,6	0,48	1,28	0,48
6,40			6,40	6,8			13,12	1,04	0,68
6			11,2	9,76	13,6	6,40	3,6	2	3,28
4,96			9,60	10,4	8,8	6	1,6	1,28	2,16
0,24							0,16	0,16	
			I	0,28			0,16	0,12	0,20
1,4			4,9	2			0,56	0,48	0,48
0,72			1,44				0,56	1,36	
1,04			2,08	3,36			0,56	0,64	

Figure 15



Teneur en Asp.  et en Asp.NH₂ 

Figure 16



Teneur en Asp.  et en Asp.NH₂ 

L'acide glutamique, sous sa forme libre ou à l'état de glutamine, est particulièrement abondant pour les essais A et C (voir figures I3, I4).

Pour l'essai A (lot n° 4) cultivé en lumière naturelle et avec du matériel organique, nous avons obtenu :

- Teneur en glutamine : $24,6\mu$ môle/g poids sec.
- Teneur en acide glutamique : $89,6\mu$ môle/g poids sec.

Pour l'essai C (lot n° I4), cultivé en lumière artificielle et avec du matériel organique, par exemple :

- Teneur en glutamine : 36μ môle/g poids sec.
- Teneur en acide glutamique : 280μ môle/g poids sec

Leurs concentrations s'élèvent progressivement dans tous les lots avec les concentrations croissantes en azote; mais, surtout, les teneurs sont plus élevées dans les essais avec la lumière artificielle.

En général, pour tous les autres acides aminés qui sont moins abondants dans la racine des betteraves, on remarque qu'avec des quantités croissantes d'azote leurs concentrations croissent progressivement.

Il y a, cependant, des exceptions pour certains lots, par exemple lots 5 et I5: malgré leur concentration élevée en azote, leur teneur en acides aminés est plus basse que dans les lots 4 et I4.

Nous expliquerons ces anomalies par le même phénomène que celui qui conduit à la diminution de la teneur en azote dans les lots 5 et I5.

Figure 13
Teneur en Glu.  et en GluNH₂ 



u moles
200

Figure 14

Teneur en Glu. et en Glu.NH₂

ESSAI C

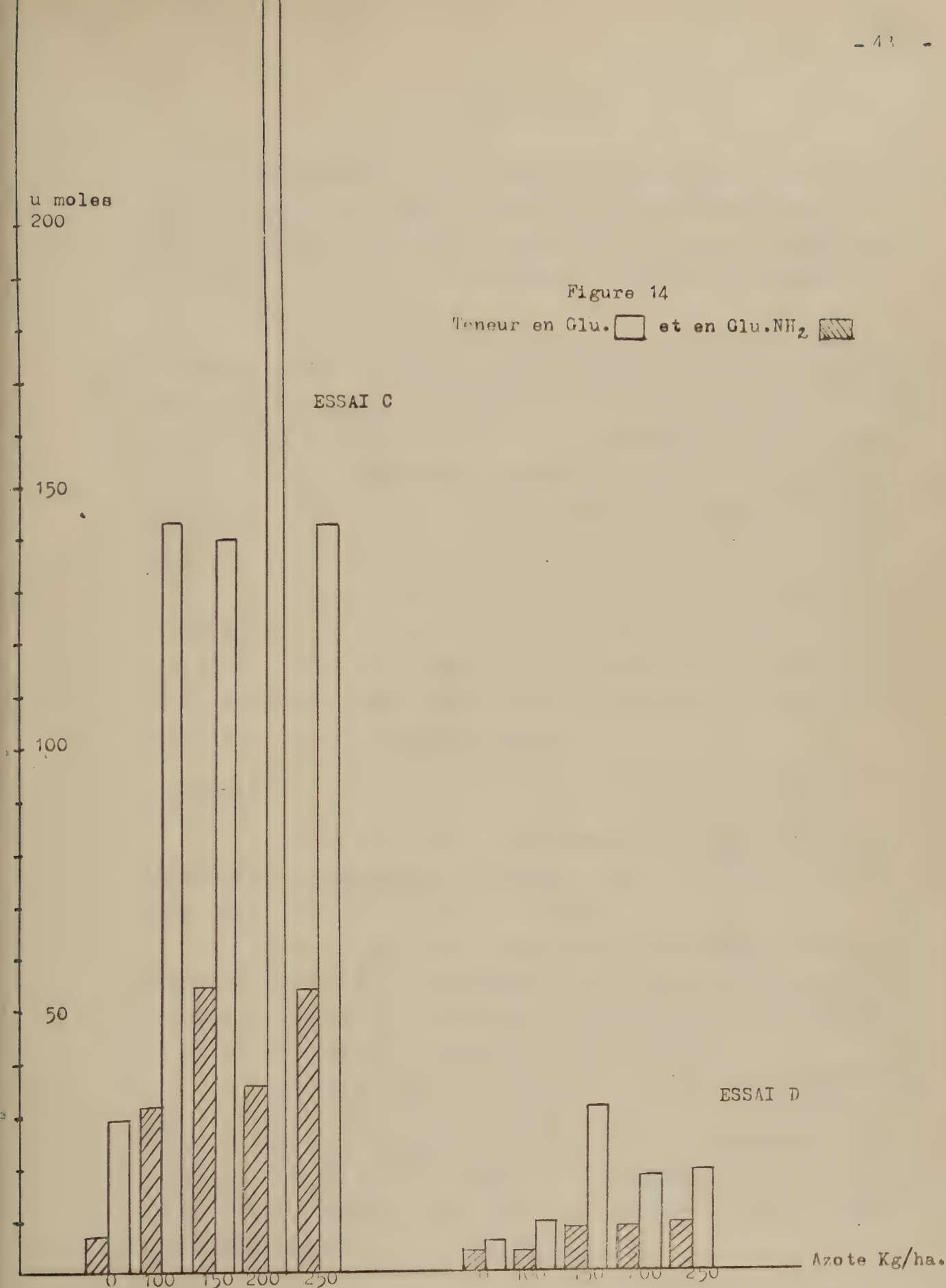
150

100

50

ESSAI D

Azote Kg/ha.



- CONCLUSION -

Au cours de cette étude, nous avons voulu voir l'influence de la fumure azotée et du matériel organique sur les teneurs en acides aminés, en sucre, en non-sucre, en azote, et sur le développement du bouquet foliaire. Nous pouvons conclure que :

1°- En général, l'application de doses croissantes de fumure azotée augmente les teneurs en acides aminés, en azote total et en non-sucre. Il y a, cependant, des exceptions, pour l'essai A (lot 5 : 250 kg/ha de fumure azotée et de matériel organique, cultivé en lumière naturelle), et pour l'essai C (lot 15: 250 kg/ha de fumure azotée et de matériel organique, cultivé en lumière artificielle). Dans ces deux lots, on remarque une diminution de l'azote total, une diminution de la teneur en acides aminés et une augmentation de la teneur en non-sucre. Dans ces deux derniers cas (avec des quantités croissantes de fumure azotée et de matériel organique), nous avons peut-être dépassé la quantité d'azote "niveau critique".

Ceci a entraîné un déséquilibre dans le cycle de végétation, d'où les pertes que nous avons remarquées.

2°- Les quantités croissantes de fumure azotée diminuent la production de sucre, pour les essais A, B, C. Ceci n'est pas vrai pour les essais D.

3°- Les quantités croissantes de fumure azotée et organique augmentent fortement les teneurs en acides aminés à fonction amine, en particulier (glutamique et aspartique) et à fonction amide (asparagine, glutamine).

L'engrais azoté n'a pas une influence considérable sur la teneur des autres acides aminés, par exemple : sérine, glycine, alanine, valine, lisine, histidine et arginine. Mais, dans l'essai C, on remarque une influence de la fumure azotée plus forte que pour les autres essais (voir tableau 4).

Au point de vue des rendements en sucres et poids de racine, les lots I et II cultivés avec un équivalent de 30 tonnes/ha de matériel organique et en lumière naturelle et artificielle, respectivement, semblent les meilleurs.

Pour les lots cultivés sans azote et sans matériel organique, le meilleur rendement en sucre se trouve au n° 6.

Pour l'essai D, cultivé avec engrais azoté et sans matériel organique, mais en présence d'un éclaircissement continu, de meilleurs rendements en sucre sont obtenus, malgré l'augmentation progressive de l'azote (lots I6 à 20).

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

- BIBLIOGRAPHIE -

- 1 . BAZIER R. & GUERILLOT J., 1966. Influence de quelques fumures sur les acides aminés du grain de blé et de la racine de carotte. Annales Agronomiques 17, 677, 678.
- 2 . BOULANGER J., POLONOVSKI F., TAYEAU P., MANDEL & BISERTE G., 1966. Biochimie médicale. 130.
- 3 . CODEX, PHARMACOPÉE FRANÇAISE, 1965. Méthode de dosage des sucres réducteurs. VIII^e Edition. 1590.
- 4 . DUBOURG J., DEVILLERS P., SAUNIER R., 1955. Evolution de l'azote de la betterave, au cours de sa végétation, pendant son stockage et après sa mise en oeuvre en sucrerie, dans les produits de fabrication. Ind. Ag. Alim. 18, 729.
- 5 . FREED B., & HIBBERT D., 1955. Nitrogenous constituents of beet sugar factory juices and molasses. The International Sugar Journal. Nov. 404.
- 6 . LECOQ R., 1965. Manuel d'analyses alimentaires et d'expertises usuelles. 1 , 243-248.
- 7 . LEDERER E., & Collaborateurs, 1960. Chromatographie en Chimie organique et biologique. 2 , 295, 331-338.
- 8 . LUCILE R., ALBERT C., WALKER , & DOWLING B., 1961. The effect of fertilization on the glutamic acid content of sugar beets in relation to sugar production. Journal of the ASSBT. XI , 535, 536.
- 9 . MILLAR C.E., & TURK L.M., 1964. Activities of soil microbes in relation to the growth of higher plants. Fundamentals of soil science. 216.

